

原 著

Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP)法 によるボカウイルス迅速検出法の検討

矢野拓弥, 前田千恵, 小林章人, 赤地重宏,
松野由香里, 山寺基子, 楠原 一, 永井佑樹,
小林隆司, 西中隆道

Examination of the Efficacy of Loop-mediated Isothermal Amplification Method for the Rapid Detection of Human Bocavirus

Takuya YANO, Chie MAEDA, Akihito KOBAYASHI, Shigehiro AKACHI,
Yukari MATSUNO, Motoko YAMADERA, Hajime KUSUHARA, Yuhki NAGAI,
Takashi KOBAYASHI and Takamichi NISHINAKA

ボカウイルス(Human bocavirus : HBoV)のNP1遺伝子を標的としたLAMPプライマーを設計し, Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP)法による迅速検出法を検討した. その結果, HBoV-LAMP法は, Conventional-PCR法(従来法)と同等以上の感度を有し, 他の呼吸器系ウイルスとの交差反応は認められないことを確認した. 従来法と比較すると検査に要する時間が1/4~1/5程度に短縮でき, 簡便かつ高感度にHBoV遺伝子の検出が可能であった. またLAMPプライマーの設計は比較的簡便であり, 簡易迅速診断キットが開発されていない感染症への応用が可能である. 今後, インフルエンザウイルスA(H7N9)およびMERSコロナウイルス等のような新種の感染症発生時の迅速検出ツールとして, LAMP法による迅速診断可能な検査態勢を整備することは公衆衛生の向上に寄与するものと考えられた.

キーワード: 急性呼吸器感染症, ボカウイルス, LAMP法

はじめに

ボカウイルス(Human bocavirus : HBoV)は, パルボウイルス科パルボウイルス亜科ボカウイルス属に分類されており¹⁾, 2005年にスウェーデンの呼吸器感染症患者から初めて発見され, その後, 世界的に分布していることが判明したウイルスである¹⁻⁶⁾. HBoVは小児を中心とした急性呼吸器感染症(Acute respiratory infection:ARI)の起因ウイルスの一つであるが, 胃腸炎症状との関連性も報告されているが依然として不明な点があり, 現在国内におけるHBoVの検出情報および疫学情報の蓄積が進められている⁷⁻⁹⁾. 国内において2010年に国立感染症研究所より「ボカウイルス検査マニュアル」¹⁰⁾が示され, 三重県では従来から実施してきた呼吸器系ウイルスの感染症発生動向調査の項目¹¹⁻¹⁴⁾に加え, 2010年からHBoVの動向調査を実施している. 2010年~2013年6月までに調査した654検体中, 23件(3.5%)でHBoVが検出された. HBoVは, 小児の集中治療室での院内感染による

ARI感染症発生時のスクリーニングの対象疾患とすることを考慮すべきと示唆されているが¹⁵⁾, 現在のところHBoV簡易迅速診断キットは開発されておらず, 医療機関での実施は困難である. そこで我々は従来法のPCR法^{1,10)}よりも簡便で迅速性を備え, 数々の応用実績¹⁶⁻¹⁸⁾を有するNotomiら¹⁹⁾のLoop-mediated isothermal amplification(LAMP)法を用いたHBoVの迅速検出系を構築し有用性を検討したので報告する.

材料と方法

1. 供試検体

1) HBoV陽性臨床検体

2012年~2013年に三重県感染症発生動向調査事業にて, 定点医療機関を受診し使用承諾の得られた呼吸器系疾患患者から採取した臨床検体342件より抽出したDNAを用いてAllanderら^{1,10)}のConventional-PCR法によりHBoV(NP1領域およびVP1領域)の検出を実施した. 得られた5件

(No.2012-213, 2012-245, 2012-456, 2013-240, 2013-421)のPCR産物の塩基配列を決定しHBoVであることを確認した¹⁰⁾。これらをHBoV陽性コントロールとして、LAMP法によるHBoV迅速検出系(HBoV-LAMP法)の構築に関する反応温度条件等を検討した。

2) 各種ウイルス株および陽性臨床検体による交差反応性

呼吸器系ウイルス分離株および各種ウイルス陽性者の臨床検体は以下を用いた。インフルエンザウイルス分離株はA/H1N1, A/H1N1pdm, A/H3N2, InfB, InfCについて各々3株を使用した。陽性臨床検体は、パラインフルエンザウイルスI型, II型, III型(PIV I, PIV II, PIV III), RSウイルス(RSV), ヒューマンメタニューモウイルス(Hmpv), ヒューマンコロナウイルス(HCoV), ヒューマンライノウイルス(HRV)を各々3検体用いて交差反応性の有無を検討した。

3) 臨床検体

2013年に三重県感染症発生動向調査事業にて使用承諾が得られ採取された臨床検体129件を用いて、HBoV-LAMP法による検出に関する検討およびConventional-PCR法との検出感度等の検証をした。

2. HBoV-LAMP法プライマーの設計

LAMP法プライマーは、Gene Bank に登録されているHBoV (ACCESSION No: DQ677522)のNP1遺伝子を標的配列とし、ソフトウェア(Primer Explorer Ver.4 FUJITSU LIMITED)を利用してNP1遺伝子の6領域を認識するようにForward outer primer(F3), Backward outer primer(B3), Forward inner primer(FIP), Backward inner primer(BIP), Loop primer-F(Loop-F), Loop primer-B(Loop-B)を設計した。

3. HBoV-LAMP法

LAMP法の反応液は、Loopamp DNA増幅試薬キット(栄研化学)と設計した6つのLAMPプライマー(Table1)を用い、専用のLoopamp反応チューブで以下のように調製した。添付試薬(Reaction Mix 12.5 μ L, Distilled Water 3.5 μ L, Bst DNA Polymerase 1 μ L), LAMPプライマー0.5 μ Lおよび抽出DNA 5 μ Lを含む25 μ L系で反応させた。

測定にはLoopampリアルタイム濁度測定装置LA-320C(テラメックス)を用いて濁度の変化を一定温度(60~65°C)で60分間測定した。60分以内に濁度の上昇が認められた場合を陽性、認められなかった場合を検出限界以下(陰性)とした。

4. HBoV-LAMP 増幅産物の特異性

Table 1. Primers used for LAMP of HBoV.

LAMP primer	Sequence(5' → 3')
F 3	GGAAATATGAAAGACAAGCATCG
B 3	AGCAGTGCAAGACGATAG
FIP	AGTTGTCTGCCAGTGTCTCTCTCTCTACAAAAGAAAAGGGAGT
BIP	GATCCGACACAGTGGGGAGAGTGGCTGATTGGGTGTTC
LF	GTTCATTGTCTTTTTTCCCCGATG
LB	GTGGTGTGGGTCTACTGGCAC

HBoV-LAMP 法の増幅 DNA 産物を用いて制限酵素処理による特異性試験を行った。制限酵素はHBoV のNP1 領域の遺伝子配列情報から認識部位を有する制限酵素(Sau3AI)を用いた。処理は37°Cで12時間、その後2%アガロースゲルで泳動後の制限酵素切断パターン像を確認した。

結 果

HBoV 陽性コントロール(No.2012-245)を用いてHBoV-LAMP 法による反応温度条件を検討した結果、反応温度 65°Cでは44分で濁度増幅曲線の立ち上がりが見られ、陽性と判定した。他の反応温度条件は62.5°Cでは34分であり、60°Cにすると29分と濁度検出に要する時間が最も短かった(Fig1)。また同検体からの抽出DNAで 10^{-7} までの希釈系列を作成し、反応温度60°Cで検出限界を検討したところ、 10^{-4} 希釈が60分以内にHBoV陽性となり、検出限界濃度であった(Fig2)。このHBoV陽性のLAMP増幅産物を用いて特異性試験を実施した。LAMP法の増幅産物は、標的遺伝子の相補的な配列を繰り返す構造で、大きさの異なるサイズの増幅産物ができ電気泳動像はラダー状の特徴的な増幅DNAバンドを示す。今回検討した電気泳動像はラダー状の泳動パターン(Lane1)を示し、制限酵素(Sau3AI)処理後の電気泳動像は2つのバンド(Lane2)に切断され、特異性が確認された(Fig3)。他のHBoV陽性の臨床検体(No.2012-213, 2012-456, 2013-240, 2013-421)についての検討結果は31分~42分の間に4件全てで陽性となった。さらにウイルス分離株(A/H1N1pdm, A/H1N1, A/H3N2, InfB, InfC)と各種陽性検体(PIV I, PIV II, PIV III, RSV, Hmpv, HCoV, HRV)について、反応温度60°Cで交差反応性の検討を実施したが、60分以内には増幅は全く認められず、交差性は無いことが確認された。

2013年に三重県感染症発生動向調査事業にて採取された呼吸器系疾患患者の臨床検体129件を用いてConventional-PCR法およびHBoV-LAMP法で検討した結果、Conventional-PCR法での陽性は4検体であったが、HBoV-LAMP法では5検体が陽性と判定された。Conventional-PCR法を基準としたHBoV-LAMP法の感度は100%(4/4)、特異度は99.2%(124/125)、一致率は99.2%(128/129)であった(Table2)。

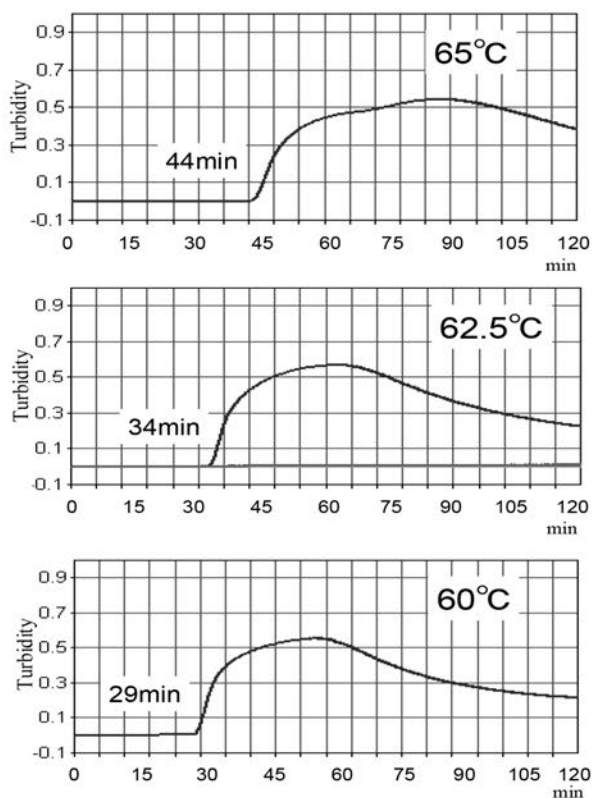


Fig 1. Thermal conditions comparison of LAMP.

考察

HBov-LAMP 法は Conventional-PCR 法と同等以上の感度を有し、増幅反応後の染色および電気泳動が不要であるため、増幅産物による検査室の汚染を防止できるメリットがある。Conventional-PCR 法と比較すると検査に要する時間が 1/4~1/5 程度に短縮できるので、二次感染や集団感染の起こりやすい病院、学校・施設内の対応には、高感度で迅速性を備えた本診断法は危機管理の上で有用である。また LAMP プライマーの設計は比較的簡便であり、今回検討した HBov のように簡易迅速診断キットが開発されていない感染症への応用が可能である。今後、インフルエンザウイルス A(H7N9)および中東呼吸器症候群(MERS コロナウイルス)等のような新種の感染症発生時の迅速検出ツールとして、LAMP 法による迅速診断可能な検査態勢を整備していくことは

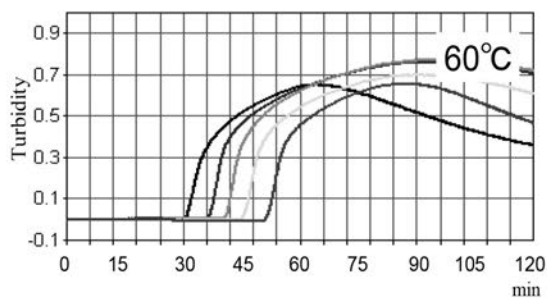


Fig 2. Detection limit of HBov in clinical specimens. From left to right, the amplification curves indicate a 10-fold dilution series from 10^0 to 10^{-4} of a sample.

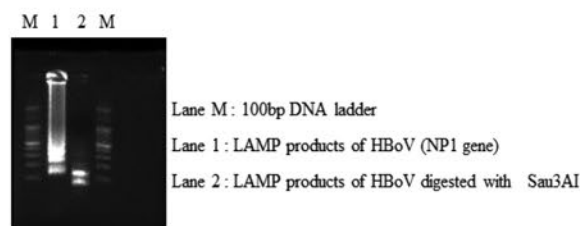


Fig 3. Restriction enzyme digestion of LAMP products.

Table 2. Sensitivity and specificity of LAMP.

HBov-LAMP	Conventional-PCR		Total
	Positive	Negative	
Positive	4	1	5
Negative	0	124	124
Total	4	125	129

公衆衛生の向上に寄与するものと考えられた。

文献

- 1) Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B : Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples, *Proc Natl Acad Sci*, **102**, 12891-12896, (2005).
- 2) J.Y.Chung, T.H.Han, C.K.Kim, S.W.Kim : Bocavirus infection in hospitalized children, South Korea, *Emerg. Infect. Dis*, **12**, 1254-1256, (2006).
- 3) Foulongne V, Olejnik Y, Perez V, Elaerts S, Rodiere M, et al : Human bocavirus in French children, *Emerg. Infect. Dis*, **12**, 1251-1253, (2006).
- 4) Sloots TP, McErlean P, Speicher DJ, Arden KE, Nissen MD, Mackay IM : Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children, *J. Clin. Virol*, **35**, 99-102, (2006).
- 5) Smuts H, Hardie D : Human bocavirus in hospitalized children, South Africa, *Emerg. Infect. Dis*, **12**, 1457-1458, (2006).
- 6) Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, et al: Human bocavirus infection in young children in the United States: Molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus, *J. Infect. Dis*, **19**, 1276-1282, (2006).
- 7) 国立感染症研究所感染症疫学センター : 年別ウイルス検出状況, 由来ヒト, ヘルペス群 & その他のウイルス, 2009~2013年 (<https://nesid3g.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data95j.pdf>)
- 8) 改田厚, 久保英幸, 入谷展弘, 後藤薫, 長谷篤 : 乳幼児呼吸器感染症患者からのヒトボカウイルスの検出-大阪市, 病原微生物検出情報, **29**,

- 161-162, (2008).
- 9) 川上百美子, 嶋田啓司: 徳島県における小児のヒトボカウイルスの罹患状況について, 徳保薬環七年報, No1, 13-17, (2011).
 - 10) 国立感染症研究所: ボカウイルス検査マニュアル, (2010).
 - 11) 矢野拓弥 他: 2012年3月に検出されたC型インフルエンザウイルスの系統樹解析-三重県, 病原微生物検出情報, **33**, 199, (2012).
 - 12) 矢野拓弥, 前田千恵, 楠原 一, 赤地重宏, 松野由香里, 山寺基子, 岩出義人, 片山正彦, 山口哲夫: 三重県におけるパラインフルエンザウイルスの動向, 三重保環研年報, 第 14号(通巻第 57号), 52-55, (2012).
 - 13) 矢野拓弥 他: 呼吸器症状を呈した小児から検出されたHuman coronavirus(2013年1~4月)-三重県, 病原微生物検出情報, **34**, 170-172, (2013).
 - 14) 三重県感染症情報センター: 三重県病原体検査情報, (<http://www.kenkou.pref.mie.jp/byougentai/kenshutu.htm>).
 - 15) Durigon GS, Oliveira DB, Vollet SB, Stormi JG, Felicio MC et al: Hospital-acquired human bocavirus in infants G.S, J. Hosp. Infect, **76**, 171-173, (2010).
 - 16) Hong TC, Mai QL, Cuong DV, Parida M, Minekawa H, Notomi T, Hasebe F, Morita K: Development and Evaluation of a Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus, J. Clin. Microbiol, **42**, 1956-1961, (2004).
 - 17) 矢野拓弥, 大熊和行: Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification法による新型インフルエンザウイルス(A/H1N1pdm)迅速検出法の有用性, 日本環境感染学会誌, **26**, 305-310, (2011).
 - 18) Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K: Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex, M. avium, and M. intracellulare, J. Clin. Microbiol, **41**, 2616-2622, (2003).
 - 19) Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al: Loop-mediated isothermal amplification of DNA, Nucleic Acid Res, **28**, e63, (2000).

Examination of the Efficacy of Loop-mediated Isothermal Amplification Method for the Rapid Detection of Human Bocavirus

Takuya YANO, Chie MAEDA, Akihito KOBAYASHI, Hajime KUSUHARA, Shigehiro AKACHI,
Yukari MATSUNO, Motoko YAMADERA, Hajime KUSUHARA, Yuhki NAGAI,
Takashi KOBAYASHI and Takamichi NISHINAKA

Keywords: Acute Respiratory Infections(ARI), Human Bocavirus, Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method

Primers targeting the NP1 gene of Human Bocavirus (HBoV) for Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) method were designed and applied to the rapid detection of HBoV. The results confirmed that HBoV-LAMP method has a level of sensitivity equal to or higher than that of conventional PCR (conventional methods), and no cross-reactions with other respiratory viruses were observed. In addition, as the design of LAMP primers is relatively simple, our results suggest that simple and rapid diagnostic kits can be applied to the assay of potential infectious diseases. In the future, the preparation and development of rapid diagnostic systems using the LAMP method will contribute to improvement of public health through the detection of new infectious diseases, such as Influenza A (H7N9) virus and Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV).